

## II. ЭКСПРЕССИЯ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ИНФОРМАЦИИ

### ИЗУЧЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКОГО КОНТРОЛЯ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ, КОНТРОЛИРУЮЩИХ СИНТЕЗ КИСЛЫХ ФОСФАТАЗ У ДРОЖЖЕЙ

С. А. КОЖИН, М. Г. САМСОНОВА, Е. В. САМБУК

Неспецифические фосфатазы (ортофосфат-моноэфир фосфогидролазы) микроорганизмов давно привлекают внимание исследователей и в качестве модели для изучения механизмов регуляции экспрессии генов, и как один из ключевых ферментов метаболизма фосфата [3, 22]. В зависимости от того, какие значения рН оптимальны для активности этих ферментов, различают щелочные (Е.С.3.1.3.1) и кислые (Е.С. 3.1.3.2) фосфатазы. Интерес к кислым фосфатазам (кф) дрожжей объясняется несколькими причинами.

Кислые фосфатазы относятся к экзоферментам, способным гидролизовать широкий спектр фосфомоноэфиров [25, 32]. Это обстоятельство позволяет, используя простую методику [23], тестировать активность кф непосредственно на колониях дрожжевых клеток и, таким образом, легко выявлять мутантов с измененной активностью кф [12, 13, 37], т. е. работать с признаком «активность кф», как с обычным генетическим маркером. У многих лабораторных штаммов эти ферменты экскретируются в процессе выращивания клеток в культурную среду [7], что существенно облегчает процедуру их выделения [5, 6].

Среди изозимов кф обнаружены ферменты, синтез которых при высоких концентрациях ортофосфата в культуральной среде полностью подавляется [7, 29]. Таким образом, используя простой эффектор — неорганический фосфат, можно легко переводить клетки из условий репрессии в условия dereпрессии переводом на бесфосфатную среду, и наоборот.

В последние годы к этим ферментам появился интерес и в прикладном аспекте, так как выяснилось, что промотор одного из структурных генов кф очень активен, а 5'-конец кодирующей части содержит последовательность, необходимую для экскреции фермента [27, 28, 35].

В данном обзоре будут представлены результаты изучения генетического контроля структуры и механизмов регуляции синтеза кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, выполненных в различных лабораториях мира, а также полученных сотрудниками, аспирантами и студентами кафедры генетики и селекции ЛГУ.

#### ИЗОЗИМНЫЙ СОСТАВ И СВОЙСТВА КИСЛЫХ ФОСФАТАЗ

Функции кислых фосфатаз подробно рассмотрены в предыдущем обзоре [3]. Механизмы их действия недостаточно ясны [19].

Количественный и качественный состав изозимов кф—штаммоспе-

цифические признаки. У ряда изученных штаммов обнаружено две кф—кф2 и кф3 (названия ферментов приведены в соответствии с классификацией, принятой в ЛГУ), синтез которых репрессируется при добавлении в культурную среду неорганического фосфата в концентрации 1—3 мМ, и одна, так называемая конститутивная кф (кф1), синтез которой не репрессируется фосфатом [1, 4]. У других штаммов имеется еще и третья репрессируемая кф [20, 24]. Существуют штаммы, у которых отсутствует конститутивная кф и синтез всех кислых фосфатаз репрессируется фосфатом [14]. Следовательно, наличие конститутивной кф также является штаммоспецифическим признаком. Следует отметить, что конститутивность кф1 давно вызвала сомнения. Так, у Петергофских генетических линий дрожжей этот фермент практически не синтезируется на минеральной синтетической среде с фосфатом [11], тогда как некоторые штаммы из коллекции Yeast stock center (USA) в этих же условиях синтезируют кф [14]. Недавно показано, что синтез аналога кф1 у этих штаммов индуцируется неорганическим фосфатом [26].

Количественное соотношение разных изоформ кф у разных штаммов неодинаково. Так, по данным Бестиана и др. [22], у большинства штаммов сакеллиний в условиях репрессии образуется незначительное количество кф1; в условиях дерепрессии количество кф в 30 раз превышает количество кф1 и составляет более 1% от всех растворимых белков клетки [17, 22], причем 80% из них представлены кф2. У Петергофских генетических линий (ПГЛ) удельная активность кф1, экстрактируемой в культуральную среду в условиях репрессии, лишь в 3—4 раза выше, чем в условиях дерепрессии [7, 8].

Изучение физико-химических свойств изоформ кф штаммов ПГЛ свидетельствует о различиях в первичной структуре этих белков [1, 6, 7, 8]. С другой стороны, анализ пептидов репрессируемых кф штаммов иного происхождения, проведенный Бестианом и др., показал высокую степень их гомологии [20].

### ГЕНЕТИЧЕСКИЙ КОНТРОЛЬ СТРУКТУРЫ И РЕГУЛЯЦИИ СИНТЕЗА КИСЛЫХ ФОСФАТАЗ

Генетическое изучение биосинтеза кф проводится независимо в двух лабораториях и у штаммов разного происхождения: в ЛГУ у штаммов ПГЛ дрожжей и в Осакском университете у дрожжей сакеллиний (СЛ).

**Идентификация структурных генов для кислых фосфатаз.** Структурные гены определены для двух из четырех возможных кф (табл. 1). Из таблицы следует, что структуру конститутивной кислой фосфатазы (кф1) у СЛ и у ПГЛ кодируют гены РНО3 и РНО1 соответственно, а структуру основного изоформа репрессибельных кф—кф2 кодирует РНО5 у СЛ и АСР3 у ПГЛ. Структурный ген для кф3, присутствующий в штаммах из обеих коллекций, пока маркировать однозначно не удалось. Не известен и структурный ген для кф4, так как она присутствует во всех штаммах. Не обнаружена она и в штаммах ПГЛ.

**Идентификация и анализ функций регуляторных генов.** В экспериментах по идентификации регуляторных генов в системе синтеза репрессируемых кислых фосфатаз, проведенных в лаборатории д-ра Ошима, было выявлено 8 генов, мутации в которых нарушают регуляцию синтеза кф неорганическим фосфатом (табл. 1). Следует отметить, что в этих экспериментах исследовались только кф2, поэтому в таблице нет сведений о влиянии мутаций в этих генах на кф3 и кф4, которые в этих штаммах присутствуют. Недавно в экспериментах по генетическому картированию показано, что ген РНО82 не самостоятельный ген,

Таблица 1. Структурные и регуляторные гены в системе синтеза кислых фосфатаз дрожжей

Ген	Локализация	Фенотип мутанта	Предполагаемая функция гена или его продукта
1	2	3	4
Саккариини			
RHO1 (PHOA)	—	Отсутствие кф и щф или снижение их уровня	Позитивный фактор для экспрессии PHO5 и PHO8 [29]
RHO2 (PHOB)	4п	Отсутствие дерепрессии репрессибельной кф, неспособность к транспорту неорганического фосфата	Специфический фактор для экспрессии PHO5 и PHO84 [29, 36, 37]
RHO3 (PHOC)	2п	Отсутствие кф1	Структурный ген рф1 [40]
RHO4 (PHOD)	6п	Отсутствие дерепрессии репрессибельных кф и щф; неспособность к транспорту неорганического фосфата	Активатор (позитивный фактор) транскрипции PHO5, PHO8 и PHO84 [29, 36, 37]
RHO5 (PHOE)	2п (тесно сцеплен с PHO3)	Отсутствие кф2	Структурный ген кф2 [40]
RHO6 (PHOF)	—	Отсутствие кф1	Позитивный фактор для экспрессии PHO3 [29, 39]
RHO7 (PHOG)	—	Отсутствие кф1	Позитивный фактор для экспрессии PHO3 [29, 39]
RHO8 (PHOH)	4п	Отсутствие репрессибельной щф	Структурный ген репрессибельной щф [29]
RHO80 (PHOR)	15п	Конститутивный синтез репрессибельных кф и щф и пермеазы фосфата	Негативный фактор, репрессор функции PHO4 [29, 43]
RHO81 (PHOS)	—	Неспособность к дерепрессии репрессибельных кф и щф	Медиатор [29, 43]
rho82 <sup>+</sup> (phoH)	6п (часть гена PHO4)	Конститутивный синтез репрессибельных кф и щф	Область позитивного фактора, узнающего сайт взаимодействия негативного фактора [29, 36, 38]
rho83 <sup>+</sup> (phoP)	2п (сцеплен с PHO5)	Конститутивная экспрессия PHO5	Регуляторный сайт, примыкающий к PHO5 [29]
PHO84 (PHOT)	—	Конститутивный синтез репрессибельных кф и щф; неспособность к транспорту неорганического фосфата	Компонент системы транспорта неорганического фосфата [42]
PHO85 (PHOU)	16п	Конститутивный синтез репрессибельных кф и щф	Позитивный фактор, репрессор функции PHO4 [29]
Петергофские генетические линии			
PHO1	2п	Отсутствие активности кф1	Структурный ген для кф1 [6, 8]
PHO2	2п	Снижение активности кф1	Элемент контроля синтеза кф1 [3, 5]
PHO3	—	..	То же
PHO4	—	..	То же
PHO5	..	..	То же
ASR1	—	Снижение активности кф3	Структурный ген для кф3; либо элемент контроля ее синтеза [2, 10]
ASR2	Сцеплен с ASR4	Отсутствие дерепрессии кф2, кф3 и щф	Позитивный фактор [2, 10]
ASR3	2п (сцеплен с PHO1)	Отсутствие активности кф2	Структурный ген для кф2 [1, 2, 8]
ASR4***	Сцеплен с центроммерой	Конститутивный синтез кф2, кф3 и щф	Негативный фактор [2, 3, 10, 11]

\* В скобках указаны прежние обозначения гена.

\*\* Мутации в данном локусе, как правило, доминантны или полудоминантны по отношению к аллели дикого типа.

\*\*\* В гене ASR4 возникают мутации двух типов: рецессивные мутации конститутивного синтеза кф2, кф3 и щф и доминантные, снижающие активность этих ферментов в условиях дерепрессии.

ACP5	6п	Снижение дерепрессии кф2, кф3 и щф	[10]
ACP80		Конститутивный синтез кф2, кф3 и щф; неспособность к транспорту неорганического фосфата	Структурный ген пермеазы неорганического фосфата [9, 11]
ACP81		Конститутивный синтез кф2, кф3, щф	Медиатор [10, 11]
ACP82	Сцеплен с центромерой	Конститутивный синтез кф2, кф3 и щф	Не известна [10, 11]
аср83	Сцеплен с ACP5	То же	Регуляторная область ACP5 [10, 11]
аср84 *	Сцеплен с ACP2		Регуляторная область гена ACP2 [10, 11]

а скорее представляет собой некую контролируемую область гена PNO4, так как картируется внутри него [36]. По всей видимости, PNO83 также является регуляторным сайтом, контролирующим экспрессию гена PNO5, так как возникающие в PNO83 мутации конститутивного синтеза кф2 цис-доминанты по отношению к нормальной аллели гена PNO5 и локализуются в участке, примыкающем к 5'-области гена PNO5 [29].

Предполагаемые функции других регуляторных генов суммированы в табл. 1.

У ПГЛ дрожжей обнаружено 9 генов, мутации в которых тем или иным способом нарушают регуляцию синтеза репрессибельных кф (табл. 1). Функции их, так же как генов СЛ, в значительной степени предположительны. О взаимном соответствии генов, идентифицированных в разных лабораториях, трудно говорить однозначно без проведения функционального теста на аллелизм. Однако, основываясь на общности свойств мутантов и положения на карте локализованных генов, можно сделать некоторые предварительные выводы:

Гены СЛ:	Возможный аналог ПГЛ:
PNO1	не известен
PNO2	ACP1 (?)
PNO3	PNO1
PNO4 pho82	ACP5 аср83
PNO5 pho83	ACP3
PNO6	PNO2, PNO3
PNO7	PNO4, PNO5
PNO80	ACP4
PNO81	ACP2, аср <sup>4</sup>
PNO84	ACP80
PNO85	ACP82 (?)
	ACP81 (?)

Из данных, представленных в табл. 1, следует, что исследованные гены достаточно случайно разбросаны по дрожжевым хромосомам. Единственным исключением является тесное сцепление генов, образующих кластер в правом плече хромосомы II и кодирующих структуру кф1 и кф2. Это позволило в свое время предположить, что данные гены образуют оперон, однако в дальнейшем было установлено, что каждый из этих генов обладает собственным промотором и транскрипция их идет раздельно [27, 35].

**Схемы регуляции синтеза кислых фосфатаз.** Попарное сочетание всех мутаций, влияющих на активность репрессибельных кф и щф, и мутаций, приводящих к конститутивному синтезу этих ферментов в гап-

лондных штаммах, позволило выявить иерархические отношения между ними. На основании этого были предложены модели каскадной регуляции синтеза кф для ПГЛ [3] и саке-линий [29]. Впоследствии модель каскадной регуляции синтеза фосфатаз у СЛ была пересмотрена. В работе То-е с соавт. [41] было показано, что при pH 3,0 активность кф в условиях дерепрессии отсутствует, но восстанавливается при увеличении pH до 4,0. При этом мутации в регуляторных генах RHO2 и RHO81 снимали эффект низких pH. На основании этих результатов, а также данных по картированию гена RHO4 авторы предположили, что экспрессия структурных генов кф осуществляется комплексом факторов позитивного и негативного контролей (рис. 1, а). Предполагается,

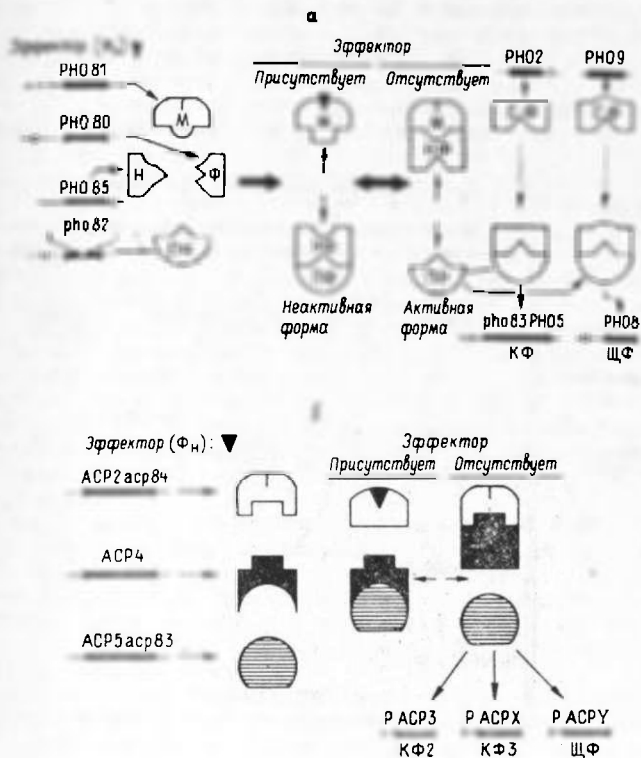


Рис. 1. Модели регуляции синтеза кислых фосфатаз у саке-линий (а) и ПГЛ (б) дрожжей.

что в клетке постоянно имеется несколько молекул позитивного фактора — продукта гена RHO4, который связывается с фактором негативного контроля (апорепрессором) в сайте, кодируемом областью RHO82. В состав комплекса также входит продукт гена RHO2. В таком виде комплекс активирует транскрипцию RHO5 и сходных с ним генов. Присоединение к комплексу корепрессора (неорганический фосфат или его метаболит) прекращает экспрессию гена RHO5. Уровень содержания или активность корепрессора могут находиться под негативным контролем гена RHO81.

Однако результаты, полученные Бостианом с соавт., объясняют

влияние низких рН на активность кФ инактивацией самого фермента [21], и, следовательно, предложенный механизм регуляции кислых и щелочной фосфатаз, видимо, не верен.

Результаты, полученные в последнее время при изучении функции АСР-генов, позволили пересмотреть модель каскадной регуляции и у *П.З. дрожжей*.

Так, установлено, что продуктами генов АСР1, АСР2, АСР5, АСР80 и АСР81 являются белки. Доказано, что функция гена АСР80 — транспорт неорганического фосфата в клетку. Обнаружен полигенный контроль синтеза кФ3, показано, что в этом процессе принимают участие гены АСР1, АСР2, а также АСР5. Сцепление последнего с АСР83 и эпистатирование мутаций в генах АСР4, АСР82 и АСР83 мутациями в гене АСР5, а также отсутствие синтеза репрессибельных кФ и шФ у мутантов по гену АСР5 позволяют предположить, что продукт гена АСР5 играет роль позитивного регулятора, т. е. необходим для экспрессии структурных генов для кФ и шФ.

Согласно новой модели (рис. 1, б) регуляция экспрессии структур-

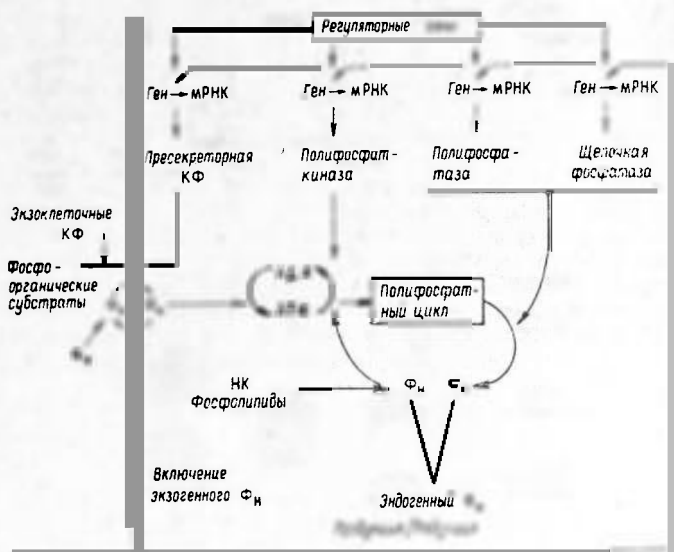


Рис. 2. Метаболизм фосфора у дрожжей [22].

ных генов кФ2 (АСР3), кФ3 и шФ (так как структурные гены для этих ферментов пока не известны, мы условно обозначили их АСРХ и АСРУ) осуществляется путем белок-белковых взаимодействий факторов позитивного и негативного контроля, кодируемых генами АСР2, АСР1, АСР5. Предполагается, что регуляторные молекулы обладают либо с активатором, либо с репрессором. Так, продукт гена АСР2 способен фактором, либо с репрессором, в то время как АСР5, либо с активатором, кодируемых генами АСР2, либо с активатором, кодируемых генами АСР5. Подобная предположения подтверждается результатами исследований мутаций в гене АСР4 и АСР82, которые взаимодействуют с промоторами структурных генов взаимодействующих с активатором (АСР5), способный связываться либо с ДНК промотора, либо с репрессором (АСР4).

В условиях репрессии эффе́ктор, связываясь с белком, кодируемым АСР2, инактивирует его, в результате чего репрессор (АСР4) взаимодействует с активатором промоторов структурных генов и делает его неспособным осуществлять транскрипцию структурных генов для кф2, кф3 и шф.

В условиях дере́прессии в комплексе находятся белковые факторы, кодируемые генами АСР2 и АСР4, вследствие чего активатор (АСР5) имеет возможность связываться с промоторами АСР3, АСРХ и АСРУ. При этом осуществляется синтез репресслируемых кислых и щелочной фосфатаз.

Функция гена АСР1 не вполне ясна, однако возможно, что его продукт участвует в транслокации кф через периплазматическую мембрану. В этом случае мутации в гене АСР1, возможно, будут иметь плейотропное влияние на активность кф1, а также секретируемой формы инвертазы.

**Доказательства транскрипционной регуляции экспрессии структурных генов для кислых фосфатаз.** Для выяснения механизма утилярных механизмов регуляции синтеза репрессибельных кислых фосфатаз изучен метаболизм мРНК этих ферментов в клетках штаммов rho3 СЛ, выращенных на средах с высокой и низкой концентрацией фосфата [20].

Обнаружено, что мРНК, выделенные из дере́прессированных клеток, программируют синтез 3 полипептидов — р60, р58 и р66, иммунологически родственных кислым фосфатазам и имеющих молекулярные массы 60 000, 58 000 и 56 000 соответственно. Эти полипептиды не синтезируются в условиях репрессии фосфатом. На основании полученных результатов Бостнан с соавт. заключили, что при дере́прессии синтез кислых фосфатаз обусловлен синтезом de novo 3 мРНК. Так как мутации rho5 приводят к отсутствию активности мРНК р60, был сделан вывод, что ген РНО5 кодирует синтез полипептида р60.

Таким образом, представленные в работе Бостнана с соавт. результаты свидетельствуют о регуляции синтеза кислых фосфатаз на уровне транскрипции.

К иному выводу пришли швейцарские авторы [33, 34]. Используя иммунологические методы, они показали, что при дере́прессии синтеза кислых фосфатаз не происходит существенного увеличения уровня этих ферментов в клетках. Дерепрессия, по мнению этих исследователей, происходит путем превращения неактивной формы кислых фосфатаз в активную. Однако эта точка зрения не нашла подтверждения в работах других авторов.

Результаты, полученные Бостнаном с соавт. [20] при изучении трансляции мРНК кислых фосфатаз в бесклеточной системе, указывают на существование в геноме дрожжей нескольких различающихся генов репресслируемых кислых фосфатаз. Для их выделения был проведен поиск в библиотеке генов дрожжей последовательностей, индуцируемых на среде с низкой концентрацией фосфата [24]. В экспериментах по блот-гибридизации было обнаружено, что индуцируемые фосфатом гены локализованы на двух EcoRI-фрагментах геномной ДНК длиной 8,0 и 5,0 тыс. п.н. При изучении содержания мРНК этих генов у мутантов с измененной регуляцией синтеза кислых фосфатаз было продемонстрировано, что у мутантов rho80 мРНК таких генов присутствует на средах как с низкой, так и с высокой концентрацией фосфата, а у мутантов rho5, rho4, rho2 эти мРНК синтезируются в незначительных количествах даже на среде с низкой концентрацией фосфата. Таким образом, уровень матриц генов, индуцируемых фосфатом, контролируется регуляторными элементами системы кислых фосфатаз.

При трансляции in vitro мРНК, гибридизирующихся с EcoRI-фрагментами, оказалось [30], что фрагмент длиной 8 тыс. п.н. кодирует

полипептид р60, являющийся продуктом гена РНО5, а фрагмент длиной 5 тыс. п.н. — полипептид р56 — продукт другого гена, экспрессия которого менее эффективно. Ген, кодирующий полипептид р58, не удалось клонировать, так как он отсутствует в геномах некоторых штаммов, в том числе и штамма, использованного для выделения генов репрессированных кислых фосфатаз.

На EcoRI-фрагментах проведена локализация кодирующих областей гена РНО5 и гена белка р56 [17]. Анализ R-петель показал, что каждый фрагмент содержит один район длиной 1,3 тыс. п.н., кодирующий мРНК кислых фосфатаз. Однако в экспериментах по блок-гибридизации, а также при гетеродуплексном анализе установлено, что фрагмент длиной 8 тыс. п.н. содержит 2 области гомологии мРНК кислых фосфатаз, одна из которых соответствует гену РНО5, а другая — гену конститутивной кислой фосфатазы РНО3, расположенному вблизи от 3'-конца гена РНО5. Таким образом, клонированные EcoRI-фрагменты содержат 3 гена, кодирующие конститутивную и 2 репрессированные фосфатом кислые фосфатазы.

Определена нуклеотидная последовательность 5'-фланкирующих и 5'-кодирующих районов гена РНО5 и гена белка р56 [35]. Нуклеотидные последовательности 5'-фланкирующих районов этих генов содержат участки обширной гомологии по обе стороны от последовательности Гольдберга — Хогнесса «TATAA», которая, однако, в гене РНО5 отстоит от точки инициации трансляции на 100 п.н., в гене для р56 — на 125 п.н. Различная организация последовательности Гольдберга — Хогнесса в этих генах может быть причиной разного уровня их экспрессии.

Нуклеотидные последовательности 5'-кодирующих областей гена РНО5 и гена для р56 также высокогомологичны. Более того, обнаружено, что первые 17 кодонов этих генов кодируют сигнальные полипептиды, необходимые для экскреции кислых фосфатаз. Установлено также, что промотор гена РНО5 содержит 2 района, из которых один, более удаленный от сайта инициации трансляции, модулирует транскрипцию, а другой, расположенный ближе к этому сайту и содержащий TATA-box, обеспечивает необходимый для транскрипции [31].

Сравнение нуклеотидных последовательностей генов РНО3 и РНО5 [27] показало, что эти гены кодируют белки длиной в 467 аминокислотных остатка [18]. Кодирующие районы генов РНО3 и РНО5 гомологичны на 87%. Гомология последовательностей 5'-фланкирующих районов составляет 65% в области, ограниченной положениями (-153) (-1) и содержащей TATA-box в положении (-99) гена РНО5 и (-95) гена РНО3. Нуклеотидные последовательности этих генов, лежащие сверху по течению от положения (-154), не гомологичны друг другу. Показано также, что ген РНО3 и ген РНО5 кодируют сигнальный пептид, необходимый для экскреции и высокогомологичный сигнальным пептидам других кислых фосфатаз.

Итак, суммируя данные о нуклеотидных последовательностях генов кислых фосфатаз, следует отметить высокую степень их гомологии. Поэтому правомочно предположение о том, что эти гены возникли в процессе эволюции путем дупликаций предкового гена [27, 31]. Затем они дивергировали в результате накопления мутаций типа замен оснований, что обеспечило организмам возможность усвоения разнообразных фосфатов берящих соединений.

В условиях депрессии белок гена РНО5 составляет 1% от общего растворимого белка клетки. Таким образом, промотор этого гена относится к числу сильных. Поэтому регуляторные сигналы этого гена могут быть использованы для экспрессии чужеродных генов, кодирующих белки, имеющие важное практическое значение. Хинисен с соавт. [28]



первыми сконструировали экспрессирующиеся векторы, содержащие промотор и сигнал терминации транскрипции гена РНО5. Присоединение чужеродного гена к промотору РНО5 в этих векторах может быть проведено: 1) в районе, расположенном между сайтами инициации транскрипции и трансляции гена РНО5, с помощью синтетического линкера, несущего иницирующий кодон АТГ, или 2) в районе, кодирующем сигнальный пептид. В последнем случае синтезируемый белок может секретироваться из клетки. Введение таких векторов в клетки дрожжей приводит к сверхсинтезу продуктов клонируемых генов. Так, например, при клонировании гена  $\alpha$ -интерферона типа Д количество этого белка составило 5% от общего растворимого белка дрожжевой клетки. Однако при клонировании этого гена путем присоединения к району, кодирующему сигнальный пептид, общее количество синтезируемого интерферона снижалось до 0,5%, и только часть этого белка секретировалась из клеток.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, в данном обзоре представлены результаты исследований генетического контроля регуляции биосинтеза фосфатаз у дрожжей, а также первых попыток, предпринятых для выяснения молекулярных механизмов этих процессов. В настоящий момент не вызывает сомнения то, что существует «семейство» генов, определяющих структуру фосфатаз, причем как количество, так и нуклеотидный состав этих генов, включая промоторные и терминаторные области, несмотря на существующую гомологию, различен у штаммов разного происхождения. Наиболее вероятное объяснение этого факта — многократная дупликация так называемого прагена, которая и привела к образованию в геноме дрожжей серии структурных генов кислых фосфатаз, впоследствии эволюционирующих независимо. В последнее время утвердилось представление, что подобные перестройки генома связаны с участием перемещающихся генетических элементов [16]. В наших исследованиях получены результаты, свидетельствующие о том, что одновременное блокирование функций генов *rho1 asr3* — структурных генов для *kf1* и *kf2* — может быть результатом inserции какого-то транспозона. Это согласуется с данными Ошима о существовании в пределах гена *rho5* (*asr3*) мишени для транспозона *Tu1*. Анализ нуклеотидной последовательности клонированных структурных генов выявил существование очень активного промотора в гене РНО5, а также сигнальной последовательности, необходимой для экскреции структурного белка через плазматическую мембрану. Это открытие сразу нашло применение в экспериментах по геной инженерии и привело к созданию штаммов дрожжей, способных продуцировать лейкоцитарный интерферон человека под контролем промотора РНО5.

К сожалению, успехи в изучении собственно механизмов регуляции синтеза фосфатаз, а также структуры и функции регуляторных генов пока гораздо скромнее. До сих пор не известны конкретные функции большинства обнаруженных регуляторных генов. Исключения составляют гены, контролирующие транспорт неорганического фосфата в клетку, то есть те гены, определяют они структуры пермеазы фосфата или механизмов транспорта фосфата в клетку. Не вызывает, пожалуй, сомнения лишь то, что регуляция синтеза всех фосфатаз, и кислых и щелочных, контролируется общей генетической системой, однако пока не ясно, участвуют ли элементы этой системы в регуляции синтеза других ферментов метаболизма фосфата (рис. 2).

Рассмотренные в обзоре материалы позволяют считать, что продуктами всех известных регуляторных генов являются белковые моле-

культы, которые, скорее всего, синтезируются конститутивно. Анализ характера взаимодействия мутаций в разных регуляторных генах привел к созданию разнообразных схем регуляции синтеза фосфатаз. Нам представляется наиболее вероятным, что процесс передачи сигнала о наличии или отсутствии неорганического фосфата в культуральной среде осуществляется с помощью белковых молекул — продуктов регуляторных генов, путем белок-белковых взаимодействий. Соответствующая схема, представленная в обзоре, хорошо объясняет полученные к настоящему времени результаты, однако, безусловно, нуждается в экспериментальной проверке.

### Summary

In this review the data on genetical control and regulatory mechanisms of acid and alkaline phosphatase synthesis are presented. Moreover the phosphatase role in general system of phosphate metabolism in the yeast cell is discussed. It was demonstrated that the quantity of phosphatase isozymes and their physical-chemical characteristics are strain-dependent. Taking into consideration all the data presented the conclusion can be drawn that the difference in number and nucleotide content of phosphatase structural genes (including regulatory regions) can be stimulated for duplication of ancestral gene and divergence of duplicated genes. The possible role of transposable elements in this process is considered. Based on experimental results and published data uncontradictory scheme of phosphatase biosynthesis regulation is presented.

### УКАЗАТЕЛЬ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Атанасов Б. К. Генетико-биохимическое изучение регулируемых кислых фосфатаз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Автореф. канд. дис. Л., 1980, 21 с.
2. Кожин С. А., Самсонова М. Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* IV. Генетический контроль активности кислой фосфатазы II. — Генетика, 1975, т. XI, № 7, с. 104—112.
3. Кожин С. А., Тер-Аванесян М. Д. Сравнительная генетика неспецифических фосфомоноэстераз у микроорганизмов. — Исслед. по генетике. Л., 1979, № 8, с. 89—109.
4. Кожин С. А., Краснопецева Н. Г., Самсонова М. Г. и др. Генетический контроль репрессии кислых фосфатаз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: IV Всесоюзный симпозиум «Молекулярные механизмы генетических процессов»: Тез. докл. М., 1979, с. 117.
5. Краснопецева Н. Г., Падкина М. В., Тер-Аванесян М. Д., Смирнов М. Н. Генетико-биохимическое изучение кислой фосфатазы I дрожжей. — В кн.: Тезисы конференции по генетике промышленных микроорганизмов Цахкадзор, М., 1973, с. 76.
6. Краснопецева Н. Г., Падкина М. В., Атанасов Б. К., Смирнов М. Н. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* III. Выделение и характеристика кислой фосфатазы I. — Вестн. Ленингр. ун-та, 1979, № 15, с. 97—103.
7. Падкина М. В., Краснопецева Н. Г., Петрашень М. Г. и др. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* I. Характеристика кислых фосфатаз разных штаммов. — Генетика, 1974, т. X, № 11, с. 100—110.
8. Падкина М. В. Изучение функций генов, контролирующих активность кислой фосфатазы I у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Автореф. канд. дис. Л., 1978, с. 24.
9. Самбук Е. В., Аленин В. В., Кожин С. А. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей. Сообщение XI. Ген АСР80 контролирует транспорт неорганического фосфата. — Генетика, 1985, т. XXI, № 9, с. 1449—1454.
10. Самбук Е. В. Изучение регуляции синтеза фосфатаз у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — Автореф. канд. дис. Л., 1985, 17 с.
11. Самсонова М. Г., Падкина М. В., Краснопецева Н. Г. и др. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. V. Генетический контроль регуляции синтеза кислой фосфатазы II. — Генетика, 1975, т. XI, № 9, с. 104—115.
12. Смирнов М. Н., Краснопецева Н. Г., Янулайтис А. А. Влияние мутаций на свойства кислой фосфатазы дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: Труды Всесоюзной конференции по генетике, 1982, «Общая и молекулярная генетика», вып. II, с. 103.
13. Смирнов М. Н., Краснопецева Н. Г., Инге-Вечтомов С. Г., Янулайтис А. А. Изучение мутантов по экзогенной фосфатазе дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. — В кн.: Исследования по генетике. Л., 1974, вып. 5, с. 59—62.
14. Смирнов М. Н., Краснопецева Н. Г., Падкина М. В. и др. Сравнительный

генетико-биохимический анализ регуляции синтеза кислых фосфатаз у дрожжей разного происхождения. — Тр. XIV Международного генетического конгресса. Секционные заседания. 41, секция 1—12. М., 1978, с. 56.

15. Тер-Лавицкая М. Д., Инге-Вечтомов С. Г., Петрашень М. Г. Генетико-биохимическое изучение кислых фосфатаз дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* II. Изучение мутаций, влияющих на активность кислой фосфатазы I. — Генетика, 1974, т. X, № 12, с. 101—109.

16. Хесин Р. Б. Непостоянство генома. М., 1984. 472 с.

17. Andersen N., Thill G. P., Kramer R. A. Messenger RNA and homology mapping of two yeast repressible acid phosphatase genes. — Molec. Cell. Biol., in print.

18. Bajwa W., Meyhaek B., Rudolf H., Hinnen A. Structural analysis of two tandemly repeated acid phosphatase genes in yeast. — In: Molecular biology of yeast. Cold Spring Harbor Meeting, 1983, p. 154.

19. Boer P., Steyn-Parve E. P. Further studies on mechanism of action of an acid phosphatase from baker's yeast (*Sacch. cerev.*). Information from experiments on transphosphorylation. — Biochem. Biophys. Acta, 1970, vol. 206, p. 281—288.

20. Bostian K. A., Lemire J. M., Cannon F., Halvorson H. O. In vitro synthesis of repressible yeast acid phosphatase: Identification of multiple mRNAs and products. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, N 8, p. 4504—4508.

21. Bostian K. A., Lemire J. M., Halvorson H. O. Synthesis of repressible acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae* under condition of enzyme instability. — Molec. Cell. Biol., 1982, vol. 2, N 1, p. 1—10.

22. Bostian K. A., Lemire J. M., Halvorson H. O. Physiological control of repressible acid phosphatase gene transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. — Molec. and Cell Biol., 1983, vol. 3, N 5, p. 839—853.

23. Dorn G. Phosphatase mutants in *Aspergillus nidulans*. — Science, 1965, vol. 150, p. 1183.

24. Kramer R. A., Andersen N. Isolation of yeast genes with mRNA levels controlled by phosphate concentration. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, vol. 77, N 11, p. 6541—6545.

25. Lampen J. O. External enzymes of yeast: their nature and formation. — J. Microb. Serol., 1968, vol. 34, p. 1—18.

26. Lemire J. M., Thill G. P., Rogers D. T., Kramer Q., Bostian K. A. Regulation and organization of two tandemly duplicated yeast acid phosphatase genes. — In: Molecular Biology of yeast. Cold Spring Harbor Meeting, 1983, p. 229.

27. Meyhaek B., Bajwa W., Rudolph H., Hinnen A. Two yeast phosphatase genes are the result of a tandem duplication and show different degrees of homology in their promoter and coding sequences. — EMBO J., 1982, vol. 1, N 6, p. 675—680.

28. Meyhaek B., Hinnen A. High levels of expression of foreign genes under the control of the yeast *pho5* promoter. — In: Molec. biology of yeast. Cold Spring Harbor Meeting, 1983, p. 156.

29. Oshima Y. Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate. — In: Molecular biology of the yeast *Saccharomyces* /Ed. J. N. Strathern, E. W. Jones, J. R. Roach. Cold Spring Harbor Laboratory, 1981, vol. 2, p. 159—179.

30. Rogers D. T., Lemire J. M., Bostian K. A. Acid phosphatase polypeptides in *Saccharomyces cerevisiae* are encoded by a differentially regulated multigene family. — Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1982, vol. 79, p. 2157—2161.

31. Rudolf H., Hinnen A. Deletion scanning of the yeast *pho5* promoter. — In: Molecular biology in yeast. Cold Spring Harbor Meeting, 1983, p. 155.

32. Schmidt G., Bartsch G., Laumont M. C., Herman T., Liss M. Acid phosphatase of bakers yeast: an enzyme of the external cell surface. — Biochim., 1963, vol. 2, p. 126—131.

33. Schweingruber M. E., Schweingruber A. M. Posttranslational regulation of repressible acid phosphatase in yeast. — Molec. Gen. Genet., 1979, vol. 3173, N 3, p. 349—351.

34. Schweingruber A. M., Schweingruber M. E. Differential regulation of the active and inactive forms of *Saccharomyces cerevisiae* acid phosphatase. — Molec. Gen. Genet., 1982, vol. 187, N 1, p. 107—111.

35. Thill G. P., Kramer R. A., Turner K. J., Bostian K. A. Comparative analysis of the 5'-end regions of two repressible acid phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. — Molec. Cell. Biol., in print.

36. Toh-e A. Genetic mapping of the *pho2*, *PHO82-pho4* and *pho85* loci of yeast. — Genetics, 1980, vol. 94, p. 929.

37. Toh-e A., Ueda Y., Kakimoto S., Oshima Y. Isolation and characterization of acid phosphatase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. — J. Bacteriol., 1973, vol. 113, N 2, p. 727—738.

38. Toh-e A., Oshima Y. Characterization of dominant constitutive mutation *PHOQ* for the repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — J. Bacter., 1974, vol. 120, N 2, p. 608—617.

39. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. Two new genes controlling the constitutive

acid phosphatase synthesis in *S. cerevisiae*. — Molec. Gen. Genet., 1975, vol. 141, N 1 p. 81—83.

40. Toh-e A., Kakimoto S., Oshima Y. Genes coding for the structure of the acid phosphatase in *Saccharomyces cerevisiae*. — Molec. Gen. Genet., 1975, vol. 143, N 1, p. 65—70.

41. Toh-e A., Kobayashi S., Oshima Y. Disturbance of the machinery for the gene expression by acidic pH in the repressible acid phosphatase system of *Saccharomyces cerevisiae*. — Molec. Gen. Genet., 1978, vol. 162, p. 139—149.

42. Ueda Y., Oshima Y. A constitutive mutation, *phoT*, of three repressible acid phosphatase synthesis with inability to transport inorganic phosphate in *Saccharomyces cerevisiae*. — Molec. Gen. Genet., 1975, vol. 136, N 3, p. 255—259.

43. Ueda Y., Toh-e A., Oshima Y. Isolation and characterization of recessive, constitutive mutations for repressible acid phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. — J. Bacteriol., 1975, vol. 122, N 3, p. 255—259.

## ГЕНЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ тРНК-РИБОСОМЫ В ИНФОРМАЦИОННОЙ СУПРЕССИИ У ДРОЖЖЕЙ-САХАРОМИЦЕТОВ

В. Л. ТИХОМИРОВА, Т. С. КАРПОВА, М. Д. ТЕР-АВАНЕСЯН,  
С. Г. ИНГЕ-ВЕЧТОМОВ

Продуктивным подходом к изучению механизмов поддержания точности трансляции является изучение информационных нонсенс-супрессоров, т. е. супрессоров, возникающих за счет изменений компонентов аппарата трансляции. В настоящее время изучено два класса таких супрессоров.

Нонсенс-супрессоры первого типа появляются в результате изменения в антикодоне тРНК, приводящего к его комплементарности нонсенс-кодону [22, 41, 42]. Среди эукариотических организмов супрессоры данного типа наиболее полно изучены у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и *Schizosaccharomyces pombe*. У них в отличие от прокариот супрессорные тРНК обладают строгой кодоновой специфичностью [32, 40].

Рибосомные мутации, влияющие на точность трансляции, обнаружены у про- и эукариот. У *E. coli* выделены так называемые гам-мутанты (ribosomal ambiguity), у которых изменения структуры белков S4 (ген *gpdD*) и S5 (ген *gpdE*) малой субъединицы рибосом приводят к снижению точности трансляции. Это регистрируют *in vivo* по наличию супрессии нонсенов, а также *in vitro* в поли-U-зависимой бесклеточной белоксинтезирующей системе [23, 24].

Изменения белков S12 (ген *gpdL*) и S17 (ген *gpdQ*) малой субъединицы и белка L6 (ген *gpfF*) большой субъединицы повышают точность трансляции [33, 39]. Следовательно, контроль точности трансляции является межсубъединичной функцией рибосом [28].

У эукариот обнаружены аналогичные мутации. Так, у дрожжей *S. cerevisiae* мутационные изменения белка S11 (ген *sup46*) малой субъединицы приводят к снижению точности трансляции *in vivo* и *in vitro* [30, 31, 36]. У *Podospora anserina* две антисупрессорные мутации в генах *sup1* и *sup2* приводят к уменьшению точности трансляции в поли-U-зависимой бесклеточной белоксинтезирующей системе [37]. У эукариот контроль точности трансляции осуществляется участием большой субъединицы рибосом в контроле точности трансляции. У дрожжей *S. cerevisiae* подробно исследованы супрессорные гены *sup1* и *sup2* [5, 6], кодирующие белки большой субъединицы [44, 45]. В бесклеточной белоксинтезирующей системе мутанты *sup1* и *sup2* снижают уровень неоднозначности трансляции [43].

Отметим особенность супрессора эукариот, действующего через изменения тРНК (тРНК-супрессоры) и рибосом (рибосомные супрессо-